

# 我国棉蚜对吡虫啉和氟啶虫胺腈抗性水平监测与交互抗性分析



李仁<sup>1</sup> 梁平卓<sup>1</sup> 程沈航<sup>1</sup> 薛慧<sup>1</sup> 郭天凤<sup>1</sup> 吕楠楠<sup>1</sup>  
梁沛<sup>1</sup> 解晓平<sup>2</sup> 高希武<sup>1\*</sup>

(1. 中国农业大学植物保护学院昆虫学系, 北京 100193; 2. 中国农业科学院植物保护研究所, 北京 100193)

**摘要:** 为了解我国不同地区棉蚜 *Aphis gossypii* 对吡虫啉和氟啶虫胺腈的抗性现状, 对代表性棉区棉蚜田间种群进行抗药性监测, 同时通过构建具有R81T及V62I单突变和R81T-V62I共同突变的棉蚜烟碱型乙酰胆碱受体(nicotinic acetylcholine receptor, nAChR)蛋白模型, 与吡虫啉和氟啶虫胺腈进行分子对接, 分析这些突变在吡虫啉和氟啶虫胺腈抗性中的作用, 并分析吡虫啉和氟啶虫胺腈之间是否存在交互抗性。结果显示, 不同地区棉蚜对吡虫啉产生了高水平抗性, 抗性倍数为174.70~56 409.18, 对氟啶虫胺腈产生了低至中等水平抗性, 抗性倍数为7.35~44.63, 说明不同地区的棉蚜对氟啶虫胺腈的敏感度高于吡虫啉, 且吡虫啉抗性和氟啶虫胺腈抗性间不存在相关性。R81T、V62I单突变和R81T-V62I共同突变导致吡虫啉与棉蚜nAChR的亲和力降低, 对氟啶虫胺腈与棉蚜nAChR的结合无明显影响。R81T及V62I单突变和R81T-V62I共同突变导致棉蚜对吡虫啉产生靶标抗性, 但是对氟啶虫胺腈的抗性无明显影响, 这些突变不会导致吡虫啉与氟啶虫胺腈产生靶标突变的交互抗性。

**关键词:** 棉蚜; 吡虫啉; 氟啶虫胺腈; R81T突变; V62I突变

## Determination of resistance and cross-resistance to imidacloprid and sulfoxaflor in field populations of *Aphis gossypii* in China

Li Ren<sup>1</sup> Liang Pingzhuo<sup>1</sup> Cheng Shenhang<sup>1</sup> Xue Hui<sup>1</sup> Guo Tianfeng<sup>1</sup> Lü Nannan<sup>1</sup>  
Liang Pei<sup>1</sup> Xie Xiaoping<sup>2</sup> Gao Xiwu<sup>1\*</sup>

(1. Department of Entomology, College of Plant Protection, China Agricultural University, Beijing 100193, China;

2. Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

**Abstract:** To monitor the resistance levels of *Aphis gossypii* to insecticides imidacloprid and sulfoxaflor, various field populations in typical cotton planting areas of China were assessed, and the nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) protein models of *A. gossypii* which contain R81T mutation alone, V62I mutation alone and R81T-V62I combined mutation were built and used to dock with imidacloprid and sulfoxaflor molecules. The effects of R81T mutation alone, V62I mutation alone and R81T-V62I combined mutations of nAChR were analyzed for the resistance to imidacloprid and to sulfoxaflor, and for the cross-resistance between imidacloprid and sulfoxaflor. The results showed that the different field populations of *A. gossypii* had developed high levels of resistance to imidacloprid, the resistance ratios ranged from 174.70 to 56 409.18. And low to moderate levels of resistance to sulfoxaflor were observed, the resistance ratios were 7.35–44.63. The resistance monitoring results indicated that the sensitivity of

基金项目: 国家重点研发计划(2017YFD0201902)

\* 通信作者 (Author for correspondence), E-mail: gaoxiwu@263.net.cn

收稿日期: 2021-07-29

*A. gossypii* to sulfoxaflo was higher than that to imidacloprid in different field populations. Regression analysis showed that there was no significant correlation between the resistance to imidacloprid and the resistance to sulfoxaflo. The R81T mutation alone, V62I mutation alone and R81T-V62I combined mutations reduced the affinity of imidacloprid with nAChR, but had no significant effects on the sulfoxaflo binding with nAChR. The results suggested that the R81T mutation alone, V62I mutation alone and R81T-V62I combined mutations caused target-resistance to imidacloprid, but had no obvious effects on the resistance to sulfoxaflo. R81T, V62I and R81T-V62I mutations did not produce cross-resistance between imidacloprid and sulfoxaflo.

**Key words:** *Aphis gossypii*; imidacloprid; sulfoxaflo; R81T mutation; V62I mutation

棉蚜 *Aphis gossypii* 是一种世界性的刺吸式口器害虫,寄主植物分布广泛,能够通过刺吸植物枝叶对植物造成直接危害,另外还能传播植物病毒,其分泌的蜜露还能够引起煤污病,从而造成间接危害(Ebert & Cartwright, 1997)。目前,棉蚜的防治主要依靠化学防治。吡虫啉是一种用于防治棉蚜的新烟碱类杀虫剂,但由于长期大量使用棉蚜已经对其产生了严重抗性。如2004—2007年,河北省廊坊市、保定市和沧州市田间棉蚜种群对吡虫啉产生了中等抗性水平,抗性倍数为13.79~55.02(高占林等,2008);2011年,新疆维吾尔自治区(简称新疆)不同棉区棉蚜对吡虫啉处于敏感水平(郭天凤等,2012);2015年,山西省运城市棉蚜种群对吡虫啉产生的抗性大于1 215.07倍(Chen et al., 2017);2018年,新疆博乐市、库尔勒市、奎屯市、石河子市、五家渠市和伊犁市棉蚜种群已对吡虫啉产生了中等至高等抗性水平,抗性倍数为85.20~300.00(帕提玛·乌木尔汗等,2019)。

氟啶虫胺腈作为作用于烟碱型乙酰胆碱受体(nicotinic acetylcholine receptor, nAChR)的4C 羟亚胺类杀虫剂被推荐用于棉蚜防治。但是棉蚜对氟啶虫胺腈也产生了不同程度的抗药性,如在2014—2017年,河北省保定市和邯郸市棉蚜种群对氟啶虫胺腈的抗性不断上升,2017年这2地的棉蚜分别产生了205.39倍和197.43倍的抗性,与2014年相比分别上升了204.59倍和181.01倍(安静杰等,2020);2017年山东省滨州市和河北省沧州市棉蚜种群对氟啶虫胺腈分别产生了11.2倍和59.07倍的抗性(安静杰等,2020;Chen et al., 2020)。

解毒代谢抗性和靶标抗性是导致抗性产生的主要机制。有研究证实,细胞色素P450、葡萄糖基转移酶、羧酸酯酶和谷胱甘肽S转移酶活性的提高能介导棉蚜对吡虫啉的抗性(崔丽等,2016;Chen et al., 2019)。nAChR  $\beta$ 1亚基Loop-D区的R81T突变

和 $\beta$ 1亚基表达量的降低导致棉蚜对吡虫啉产生靶标抗性(Kim et al., 2017)。前期研究发现棉蚜对氟啶虫胺腈的抗性机制主要是解毒代谢抗性,如细胞色素P450、葡萄糖基转移酶和ATP-结合转运蛋白活性的增加和表达量的升高涉及到棉蚜对氟啶虫胺腈抗性的产生(Ma et al., 2019; 2021; Wang et al., 2021)。而关于nAChR突变是否会导致棉蚜对氟啶虫胺腈产生靶标抗性还未见报道。

Chen et al.(2017)在nAChR  $\beta$ 1亚基上除了检测到R81T突变外,还发现了新的V62I和K264E突变。K264E位于跨膜区TM1上,对氟啶虫胺腈和吡虫啉与nAChR结合的影响可能较小;V62I靠近Loop-D区域,很有可能会改变氟啶虫胺腈和吡虫啉与乙酰胆碱受体的结合能力,但是还未被证实。本研究通过检测我国棉区棉蚜对吡虫啉和氟啶虫胺腈的抗性现状,采用蛋白质-小分子对接技术分析R81T和V62I突变对吡虫啉和氟啶虫胺腈与nAChR结合能力的影响,以期明确棉蚜nAChR的R81T和V62I突变对吡虫啉和氟啶虫胺腈抗性的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试植物:棉花品种为新棉1号,种子由新疆农业科学院提供,挑选籽粒饱满的种子,一部分播种在装有蛭石的塑料盘中培养至出苗期,再转移到一次性塑料杯中水培,用于棉蚜饲养;一部分播种在混有蛭石和营养土的花盆中直到长出平整真叶后,收集真叶用于毒力测定。

供试虫源:2020年6月到9月采集来自河北省、山东省、山西省和新疆的16个不同棉花种植区的棉蚜种群。所有棉蚜种群用上述种植得到的出苗期棉花幼苗饲养2~3代后收集无翅成蚜供试,饲养室温度为(23±1)℃、相对湿度为60%、光周期为16 L:8 D。

供试药剂、试剂和仪器:97.9% 氟啶虫胺腈

(sulfoxaflor)原药,美国陶氏益农公司;95.9% 吡虫啉(imidacloprid)原药,杜邦中国上海分公司;Triton X-100,美国Sigma-Aldrich公司;其余均为国产分析纯。RXZ 智能型人工气候箱,宁波江南仪器厂;12孔细胞培养板,南通健格实验器材有限公司。

## 1.2 方法

### 1.2.1 氟啶虫胺腈和吡虫啉对棉蚜种群的毒力测定

采用浸叶法测定氟啶虫胺腈和吡虫啉对供试棉蚜种群的毒力,并略有改动。将吡虫啉和氟啶虫胺腈用丙酮分别配制成15 000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和2 000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的母液,然后用体积比0.05%的Triton X-100稀释成一系列的梯度药液用于浸叶处理。每个地方棉蚜种群毒力测定所用系列浓度有所不同,需根据实际情况进行调整,吡虫啉的浓度区间为0~10 000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,氟啶虫胺腈的浓度区间为0~100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。使用直径为21 mm的打孔器将棉花真叶打成叶碟,把叶碟分别浸入稀释好的梯度浓度药剂中15 s,以浸入0.05% Triton X-100的叶碟作为对照。把浸液后的叶碟晾干,背面朝上放置在含有琼脂的12孔细胞培养板中,将大小基本一致的无翅成蚜转移到12孔细胞培养板里饲养,每孔25~30头,每个浓度3次重复,用宣纸覆盖,于温度( $23\pm1$ ) $^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度60%、光周期16 L:8 D条件下饲养48 h后查看存活情况,用毛笔轻触虫体不动者视为死亡并记录死亡数。采用PoloPlus 2.00软件计算2种杀虫剂对棉蚜的LC<sub>50</sub>、LC<sub>90</sub>及其95%置信区间,同时计算抗性倍数。抗性倍数=药剂对野外种群的LC<sub>50</sub>/敏感基线,本研究所用棉蚜对吡虫啉和氟啶虫胺腈的敏感基线分别为0.050  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和0.624  $\mu\text{g}/\text{mL}$ (夏金,2019)。当抗性倍数<5时,为敏感;当5<抗性倍数≤10时,为低抗水平;当10<抗性倍数≤100时,为中等抗性水平;当抗性倍数>100时,为高等抗性水平。同时将计算得到的LC<sub>50</sub>转化为对数值,然后以同一地点吡虫啉和氟啶虫胺腈对棉蚜种群的LC<sub>50</sub>对数值绘制散点图,并采用Excel 2019对氟啶虫胺腈和吡虫啉LC<sub>50</sub>对数值进行一元线性回归分析,获取相关系数和回归方程,分析两者之间的相关性。

### 1.2.2 同源建模与分子对接

参考Xu et al.(2020)同源建模的方法并略有修改。以海蜗牛*Aplysia californica*的乙酰胆碱结合蛋白(PDB: 3C84)为模板。用棉蚜的 $\beta 1$ (GenBank登录号AF527785.1)、 $\alpha 1$ (GenBank登录号KR261653.1)和 $\alpha 2$ (GenBank登录号LC215866.1)亚基通过在线工具Swiss-model(<https://swissmodel.expasy.org/>)的

User-template模式进行同源建模。建模完成后使用Swiss-model自带的质量评估工具进行模型质量评估,并获取QMEANDisCo global值和氨基酸二面角拉式图,其中QMEANDisCo global值范围为[0,1],该值越大说明模型质量越好;氨基酸二面角拉式图是分析蛋白质氨基酸残基二面角 $\psi$ 和 $\Phi$ 的角度是否落在合理区域内的平面图,当有超过90%以上的氨基酸残基二面角角度落在允许区内则认为模型的构象合理,建模质量合格。本研究按照上述方法建立了4个模型,分别是敏感型(未突变)、R81T和V62I单突变模型以及R81T和V62I(R81T-V62I)共同突变模型。从ZINC(<http://zinc15.docking.org/substances/home/>)小分子数据库中获取吡虫啉和氟啶虫胺腈的三维结构。使用AutoDock 4.2软件(<http://autodock.scripps.edu/>)进行分子对接,选用半柔性方式进行对接。以 $\beta 1$ 和 $\alpha 2$ 亚基形成的乙酰胆碱结合位点作为对接活性中心,活性中心大小设置为54 Å×104 Å×68 Å,对接次数设置为100次。对接完成后选取吡虫啉和氟啶虫胺腈与nAChR敏感型和突变型蛋白模型结合能最低的构象作为结合构象,并从对接结果中获取结合能、静电能和抑制常数。使用PyMol 2.5.0软件(<https://pymol.org/2/>)对蛋白三维结构进行可视化分析,并统计吡虫啉和氟啶虫胺腈与4个蛋白模型形成氢键的个数与键长,以及吡虫啉和氟啶虫胺腈与4个蛋白模型发生π-π相互作用和π-阳离子作用的情况。使用LigPlot<sup>+</sup> 2.2软件(<https://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/software/LigPlus/>)分析4个蛋白模型与吡虫啉和氟啶虫胺腈间的疏水作用。

## 2 结果与分析

### 2.1 吡虫啉和氟啶虫胺腈对棉蚜田间种群的毒力

棉蚜对吡虫啉的抗性倍数为174.70~56 409.18,均处于高等抗性水平;棉蚜对氟啶虫胺腈的抗性倍数为7.35~44.63,处于低等到中等抗性水平之间(表1)。对吡虫啉抗性最高的是山西运城种群,对吡虫啉抗性最低的是新疆喀什种群;对氟啶虫胺腈抗性最高的是山东东营种群,对氟啶虫胺腈抗性最低的是山东滨州种群。棉蚜对吡虫啉的抗性明显高于对氟啶虫胺腈的抗性,且棉蚜对吡虫啉抗性最低和最高种群与对氟啶虫胺腈抗性最低和最高种群不重叠。

一元线性回归分析显示,氟啶虫胺腈和吡虫啉对不同地区棉蚜种群的LC<sub>50</sub>对数值不存在显著相关性( $P=0.154$ )(图1),相关系数为0.165,线性回归方

程为 $y=0.152x+0.725$ 。

**表1 2020年吡虫啉和氟啶虫胺腈对棉蚜不同田间种群的毒力**  
Table 1 Toxicities of imidacloprid and sulfoxaflor against different field populations of *Aphis gossypii* in 2020

取样点 Collecting site		药剂 Insecticide	总虫数 Total no.	斜率± 标准误 Slope±SE	LC <sub>50</sub> (95%CL)/ (μg/mL)	抗性倍数 Resistance ratio	LC <sub>90</sub> (95%CL)/ (μg/mL)	χ <sup>2</sup>	df	P
河北省 Hebei Province	衡水市 Hengshui City	吡虫啉 Imidacloprid	412	1.18± 0.20	740.55 (424.20–1 210.83)	14 810.90	8 944.51 (4 072.08–49 811.43)	12.05	10	0.28
		氟啶虫胺腈 Sulfoxaflor	544	1.21± 0.16	25.64 (19.40–33.57)	36.95	292.06 (169.84–709.80)			
山东省 Shandong Province	滨州市 Binzhou City	吡虫啉 Imidacloprid	408	0.61± 0.13	60.49 (4.81–173.57)	1 209.76	7 753.55 (2 557.70–119 903.33)	15.28	13	0.29
		氟啶虫胺腈 Sulfoxaflor	503	0.88± 0.18	5.10 (1.54–9.20)	7.35	144.48 (74.92–577.35)			
东营市 Dongying City	吡虫啉 Imidacloprid	396	1.46± 0.27	440.42 (205.42–694.72)	8 808.34	3 321.50 (1 924.51–10 038.48)	12.18	11	0.35	
		氟啶虫胺腈 Sulfoxaflor	468	1.36± 0.27	30.97 (18.20–45.81)	44.63	272.79 (148.32–971.20)			
夏津县 Xiajin City	吡虫啉 Imidacloprid	433	1.01± 0.21	426.58 (162.89–767.21)	8 531.56	7 850.22 (3 150.96–87 690.79)	12.92	11	0.30	
		氟啶虫胺腈 Sulfoxaflor	574	1.45± 0.23	28.67 (19.11–39.78)	41.31	219.06 (134.61–504.02)			
山西省 Shanxi Province	运城市 Yuncheng City	吡虫啉 Imidacloprid	481	0.84± 0.14	2 820.46 (1 396.24–5 359.65)	56 409.18	95 332.87 (33 093.49–828 800.21)	10.74	10	0.38
		氟啶虫胺腈 Sulfoxaflor	528	1.91± 0.19	20.12 (15.51–25.31)	28.99	94.16 (67.18–157.86)			
新疆维吾尔族自治区 Xinjiang Uygur Autonomous Region	阿拉尔市 Alaer City	吡虫啉 Imidacloprid	429	0.77± 0.12	110.80 (9.02–287.99)	2 215.94	5 103.27 (1 852.84–83 302.83)	26.57	11	0.01
		氟啶虫胺腈 Sulfoxaflor	459	1.18± 0.18	10.28 (6.59–13.95)	14.81	125.72 (76.29–303.49)			
博乐市 Bole City	吡虫啉 Imidacloprid	532	0.72± 0.09	239.35 (139.48–365.90)	4 787.06	14 653.49 (6 809.52–50 254.46)	8.48	13	0.81	
		氟啶虫胺腈 Sulfoxaflor	645	1.61± 0.17	20.87 (16.52–25.63)	30.08	130.55 (95.05–204.50)			
昌吉州 Changji Prefecture	吡虫啉 Imidacloprid	441	0.92± 0.15	499.65 (258.42–1 854.04)	9 992.92	12 483.17 (2 842.86–460 188.23)	15.02	10	0.13	
		氟啶虫胺腈 Sulfoxaflor	466	1.29± 0.24	5.91 (2.50–9.54)	8.51	58.59 (38.26–119.89)			
喀什市 Kashi City	吡虫啉 Imidacloprid	551	0.54± 0.15	8.74 (0.07–39.61)	174.70	2 074.24 (999.89–14 132.32)	3.76	11	0.98	
		氟啶虫胺腈 Sulfoxaflor	528	1.12± 0.17	5.51 (3.02–7.80)	7.95	76.73 (52.067–144.67)			
库尔勒市 Kuerle City	吡虫啉 Imidacloprid	582	0.44± 0.11	51.95 (3.52–144.09)	1 039.00	44 803.83 (10 202.05–2 870 823.56)	8.48	12	0.75	
		氟啶虫胺腈 Sulfoxaflor	529	1.65± 0.19	15.82 (11.43–20.54)	22.80	95.01 (66.32–164.71)			
奎屯市 Kuitun City	吡虫啉 Imidacloprid	483	1.04± 0.17	442.32 (286.69–615.87)	8 846.48	7 591.10 (3 991.90–24 612.75)	6.19	12	0.91	
		氟啶虫胺腈 Sulfoxaflor	504	1.05± 0.16	10.05 (6.08–14.06)	14.48	167.87 (97.65–437.07)			
沙湾市 Shawan City	吡虫啉 Imidacloprid	454	0.59± 0.11	1 271.11 (705.45–2 238.95)	25 422.20	190 027.84 (47 398.77–3 350 754.63)	5.72	11	0.89	
		氟啶虫胺腈 Sulfoxaflor	447	1.12± 0.17	18.23 (11.89–25.65)	26.26	256.82 (133.30–897.63)			
石河子市 Shihezi City	吡虫啉 Imidacloprid	503	0.82± 0.11	1 559.32 (961.97–2 757.28)	31 186.46	55 913.12 (20 019.16–353 921.03)	14.03	12	0.30	
		氟啶虫胺腈 Sulfoxaflor	620	1.36± 0.17	11.17 (7.91–14.48)	16.09	97.78 (68.44–167.10)			

续表1 Continued

取样点 Collecting site	药剂 Insecticide	总虫数 Total no.	斜率± 标准误 Slope±SE	$LC_{50}$ (95%CL)/ ( $\mu$ g/mL)	抗性倍数 Resistance ratio	$LC_{90}$ (95%CL)/ ( $\mu$ g/mL)	$\chi^2$	df	P
吐鲁番市 Tulufan City	吡虫啉 Imidacloprid	459	0.41± 0.10	1 459.01 (611.29–5 286.12)	29 180.18	1 921 868.39 (132 281.87–3 988 406 469.69)	6.64	13	0.92
乌苏市 Wusu City	氟啶虫胺腈 Sulfoxaflfo	578	1.46± 0.17	10.08 (7.23–12.94)	14.53	75.79 (55.00–121.31)	11.41	13	0.58
伊犁市 Yili City	吡虫啉 Imidacloprid	513	0.80± 0.12	1 498.97 (996.66–2 174.65)	29 979.42	59 376.22 (25 646.29–255 324.12)	11.12	13	0.60
	氟啶虫胺腈 Sulfoxaflfo	475	1.45± 0.19	9.37 (6.41–12.30)	13.50	71.72 (50.91–121.20)	10.43	12	0.58
	吡虫啉 Imidacloprid	487	0.59± 0.12	175.81 (31.82–407.61)	3 516.10	25 400.86 (10 151.74–172 066.69)	2.88	12	1.00
	氟啶虫胺腈 Sulfoxaflfo	504	1.39± 0.18	11.93 (7.80–16.18)	17.19	99.96 (65.97–197.32)	13.56	13	0.41

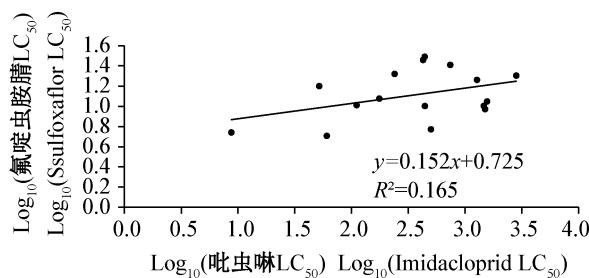
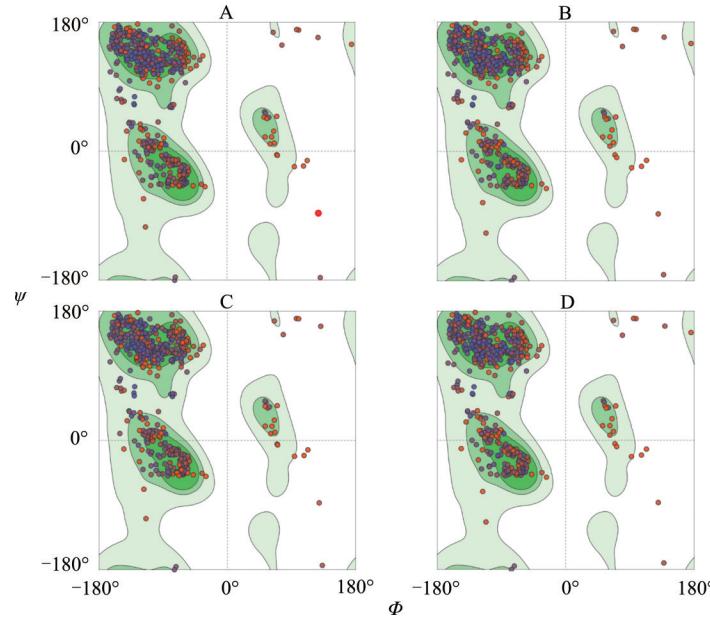
图1 氟啶虫胺腈和吡虫啉对不同地区棉蚜种群LC<sub>50</sub>对数值的线性回归分析

Fig. 1 Logarithmic linear regression analysis of LC<sub>50</sub> of sulfoxaflfo and imidacloprid among different field populations of *Aphis gossypii*



$\psi$  和  $\phi$  表示氨基酸二面角角度。白色区域表示氨基酸二面角角度不允许存在区，其余颜色区域表示氨基酸二面角角度允许存在区。 $\psi$  and  $\phi$  represent the dihedral angles of amino acids. The white area represents the area where the dihedral angles of amino acid are not allowed, and the remaining areas indicate the area where the dihedral angles of amino acid are allowed.

图2 棉蚜nAChR敏感型(A)和R81T(B)、V62I(C)及R81T-V62I(D)突变型蛋白模型的氨基酸二面角拉式图

Fig. 2 Ramachandran plots of amino acids dihedral angles between nAChR sensitive model (A) and R81T (B), V62I (C) and R81T-V62I (D) mutant protein models of *Aphis gossypii*

## 2.2 同源建模与分子对接结果分析

### 2.2.1 模型质量评估

模型质量评估结果显示，敏感型、R81T 单突变、V62I 单突变和 R81T-V62I 共同突变模型的 QMEANDisCo global 得分均为 0.65。氨基酸二面角拉式图显示，敏感型、R81T 单突变、V62I 单突变和 R81T-V62I 共同突变模型分别有 93.42%、93.27%、93.58% 和 93.27% 的氨基酸残基二面角角度落在允许区域内(图 2)。QMEANDisCo global 得分和氨基酸二面角拉式图均表明此次建立的 4 个模型质量合格，可以用于分子对接。

### 2.2.2 吡虫啉与4个模型的分子对接结果分析

敏感型、R81T及V62I单突变和R81T-V62I共同突变模型与吡虫啉的分子对接结果显示, R81T、V62I单突变和R81T-V62I共同突变模型的结合能、静电能和抑制常数均高于敏感型模型。相较于敏感型模型, R81T、V62I单突变和R81T-V62I共同突变

模型的结合能分别增加了0.08、0.06和0.05 kcal/mol, 静电能分别增加了0.13、0.10和0.26 kcal/mol, 抑制常数分别增加了0.66、0.52和0.35 μmol/L(表2)。表明R81T、V62I单突变和R81T-V62I共同突变导致吡虫啉与nAChR的亲和力变弱, 且R81T单突变造成的影响大于V62I单突变和R81T-V62I共同突变。

表 2 吡虫啉、氟啶虫胺腈与棉蚜nAChR敏感型和突变型蛋白突变模型分子对接的结合能、静电能和抑制常数

Table 2 The binding energy, electrostatic energy and inhibition constant of imidacloprid and sulfoxaflor docking with sensitive and mutant protein models of nAChR of *Aphis gossypii*

配体 Ligand	模型 Model	结合能		抑制常数 (μmol/L)
		Binding energy/ (kcal/mol)	Electrostatic energy/ (kcal/mol)	
吡虫啉 Imidacloprid	敏感型 Sensitive	-7.26	-0.53	4.80
	R81T单突变 R81T mutation alone	-7.18	-0.40	5.46
	V62I单突变 V62I mutation alone	-7.20	-0.43	5.32
氟啶虫胺腈 Sulfoxaflor	R81T-V62I共同突变 R81T-V62I combined mutation	-7.21	-0.27	5.15
	敏感型 Sensitive	-7.61	-0.01	2.66
	R81T单突变 R81T mutation alone	-7.61	-0.01	2.66
V62I单突变 V62I mutation alone		-7.59	-0.01	2.72
	R81T-V62I共同突变 R81T-V62I combined mutation	-7.58	-0.02	2.80

与敏感型模型相比(图3-A), R81T单突变虽然改变了吡虫啉与nAChR的结合能力, 但并没有明显改变吡虫啉与nAChR的结合构象, 其与吡虫啉形成氢键的氨基酸残基(TYR-216、ARG-89和LEU-127与吡虫啉形成4个氢键)以及氢键数量和键长未发生变化, 与吡虫啉发生π-π相互作用的氨基酸残基(TYR-114和TRP-159与吡虫啉发生π-π相互作用)没有发生变化, 第81位和62位氨基酸不能直接参与到与吡虫啉结合位点的形成中(图3-B)。发生R81T单突变后T81与吡虫啉的距离减小了1.1 Å, V62与吡虫啉的距离无明显变化。

V62I单突变和R81T-V62I共同突变明显改变了吡虫啉与nAChR的结合构象。与敏感型模型相比, V62I单突变模型中仅有CYS-211与吡虫啉形成1个氢键, 键长为1.8 Å(图3-C)。R81T-V62I共同突变模型中SER-210和CYS-211与吡虫啉形成2个氢键, 键长分别为2.8 Å和2.0 Å(图3-D)。V62I单突变模型中没有氨基酸残基与吡虫啉发生π-π相互作用和π-阳离子作用。R81T-V62I共同突变模型中TRP-65和TYR-209与吡虫啉发生π-π相互作用。V62I单突变和R81T-V62I共同突变后导致第81位氨基酸残基直接参与到与吡虫啉结合位点的形成中(图3-C~D), 并与吡虫啉产生疏水作用(图4)。V62I单突变后R81和I62与吡虫啉的距离分别减小了2.4 Å和1.9 Å, R81T-V62I共同突变后T81和I62与吡虫啉的距离分别减少了3.6 Å和1.7 Å。

### 2.2.3 氟啶虫胺腈与4个模型的分子对接结果分析

氟啶虫胺腈与敏感型、R81T及V62I单突变和R81T-V62I共同突变模型的分子对接结果显示, R81T单突变对氟啶虫胺腈与nAChR的结合无影响, V62I单突变和R81T-V62I共同突变对氟啶虫胺腈与nAChR的结合影响较小。与敏感型模型相比, R81T单突变模型中虽然T81到氟啶虫胺腈的距离减少了0.8 Å, 但是氟啶虫胺腈与nAChR的结合能、静电能、抑制常数和结合构象没有发生变化(表2、图5~6); 而V62I单突变和R81T-V62I共同突变模型的结合能较敏感模型分别增加了0.02 kcal/mol和0.03 kcal/mol, 抑制常数分别增加了0.06 μmol/L和0.14 μmol/L(表2), 静电能和结合构象均无明显变化(图5~6)。V62I单突变导致R81与氟啶虫胺腈的距离增加了0.3 Å, I62与氟啶虫胺腈的距离减少了0.8 Å; 而R81T-V62I共同突变导致T81和I62与氟啶虫胺腈的距离分别减少了0.9 Å和0.8 Å(图6)。

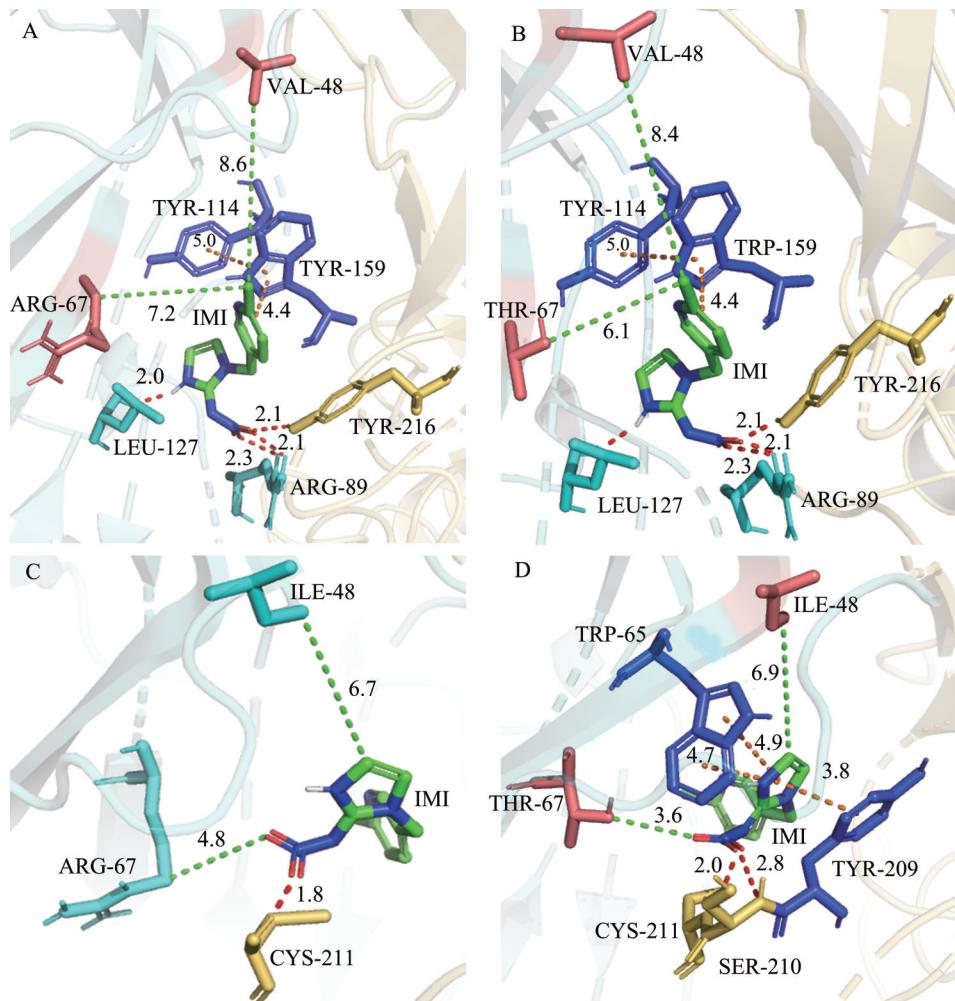
在敏感型和3种突变型模型中氟啶虫胺腈与nAChR间均无氢键形成, 也未见氨基酸残基与氟啶虫胺腈发生π-π相互作用和π-阳离子作用, 且与氟啶虫胺腈产生疏水作用的氨基酸残基无明显变化(图5~6)。

## 3 讨论

自2004年检测到山东省泰安市、德州市和菏泽市棉蚜种群对吡虫啉产生了中等水平抗性以来(Wang et al., 2007), 棉蚜对吡虫啉的抗性逐渐增强

(梁彦等,2013;安静杰等,2018)。本研究在2020年的抗性监测数据也验证了这一点,除新疆喀什市的棉蚜种群对吡虫啉的抗性倍数为174.70外,其余棉

蚜种群对吡虫啉的抗性倍数均大于1 000.00,其中河北衡水、山西运城和新疆博乐等6个地区的棉蚜种群对吡虫啉产生了10 000.00倍以上的抗性。



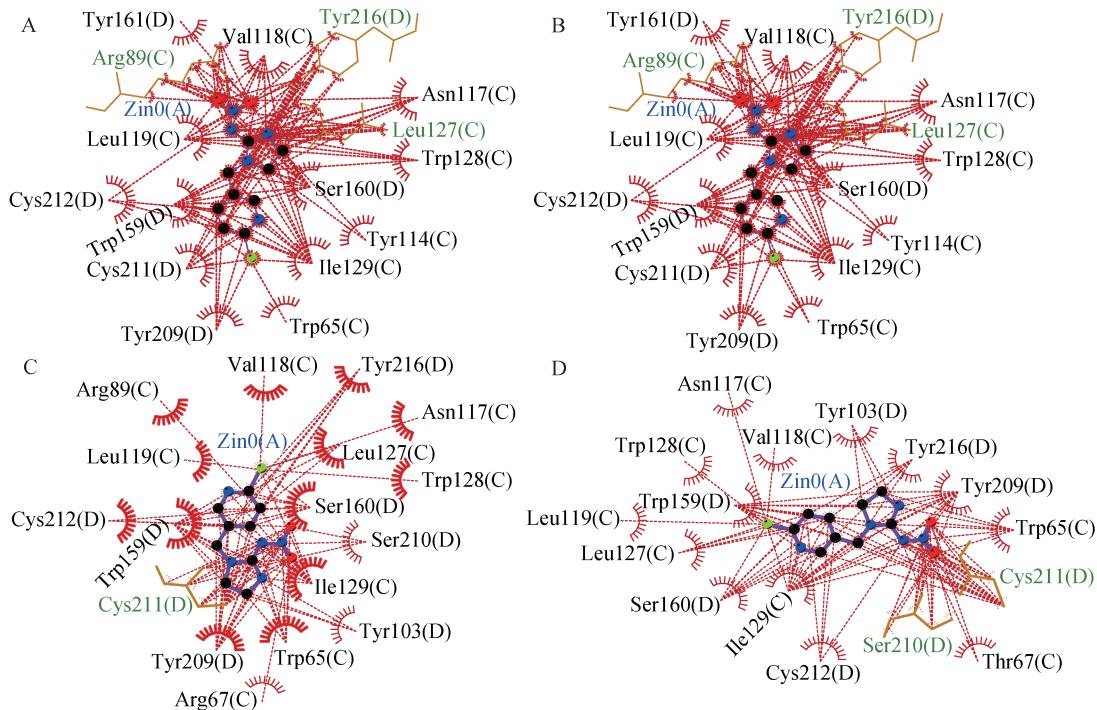
IMI表示吡虫啉;黄色氨基酸残基位于 $\alpha$ 2亚基,砖红色和浅蓝色氨基酸残基位于 $\beta$ 1亚基;红色虚线表示氢键(键长标出);绿色虚线表示 $\beta$ 1亚基第81和62位氨基酸残基(等同于第67和48位氨基酸残基)到吡虫啉的距离;深蓝色氨基酸表示与吡虫啉发生 $\pi$ - $\pi$ 相互作用,键长用橘色虚线表示并标出。IMI is imidacloprid; yellow amino acid residues are located in  $\alpha$ 2 subunit, brick red and light blue amino acid residues are located in  $\beta$ 1 subunit; hydrogen bonds are shown in red dash lines, and their bond lengths are marked; the distance between the amino acid residues 81 and 62 and imidacloprid are marked with green dash line, amino acid residues 67 and 48 are equivalent to amino acid residues 81 and 62 of the  $\beta$ 1 subunit, respectively; the dark blue acid amino acids are involved in the formation of  $\pi$ - $\pi$  interaction with imidacloprid, their bond lengths are marked with orange dash lines.

图3 棉蚜nAChR敏感型(A)和R81T(B)、V62I(C)及R81T-V62I(D)突变型蛋白模型与吡虫啉的对接构象

Fig. 3 The docking conformation of *Aphis gossypii* nAChR sensitive model (A) and R81T (B), V62I (C) and R81T-V62I (D) mutant protein models with imidacloprid

为缓解棉蚜对吡虫啉的抗性,一种具有不同结构且作用于烟碱型乙酰胆碱受体的杀虫剂——氟啶虫胺腈被用于棉蚜的防治。氟啶虫胺腈于2010年在我国获得登记,到2014年棉蚜就对其产生了抗性(安静杰等,2020)。本研究在2020年对氟啶虫胺腈的抗性监测数据显示,我国大部分地区的棉蚜种群对氟啶虫胺腈已产生了中等抗性水平。因此应当重视棉蚜

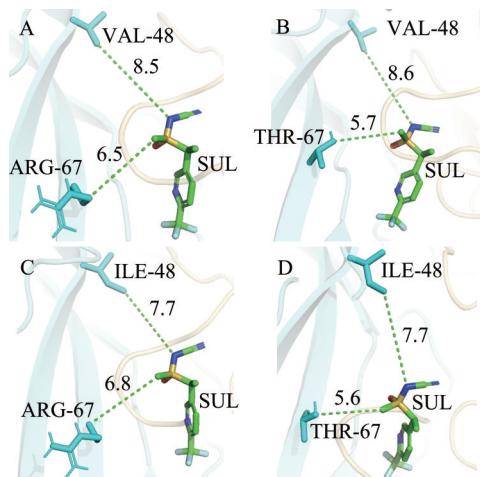
对氟啶虫胺腈的抗性问题,并采取相应措施延缓其抗性进一步增强。相比于吡虫啉,棉蚜对氟啶虫胺腈的抗性较低,且本研究结果显示吡虫啉与氟啶虫胺腈不存在交互抗性。该结论在桃蚜 *Myzus persicae* 和烟粉虱 *Bemisia tabaci* 防治药剂筛选中也被证实(Zhu et al., 2011)。



绿色字标记氨基酸残基与吡虫啉形成氢键,红色表示氨基酸残基与吡虫啉分子间的疏水作用。Zin0(A)为吡虫啉分子,(C)和(D)分别为位于 $\beta$ 1亚基和 $\alpha$ 2亚基上的氨基酸残基。The amino acids with green fonts are involved in forming hydrogen bond with imidacloprid, while the red ones are responsible for the hydrophobic interaction between amino acid residues and imidacloprid. Zin0 (A) is the imidacloprid molecule, (C) and (D) are the amino acid residues that located in  $\beta$ 1 and  $\alpha$ 2 subunits, respectively.

图4 吡虫啉与棉蚜nAChR敏感型(A)和R81T(B)、V62I(C)及R81T-V62I(D)突变型蛋白模型间的疏水作用

Fig. 4 The hydrophobic interaction between imidacloprid and *Aphis gossypii* nAChR sensitive model (A) and R81T (B), V62I (C) and R81T-V62I (D) mutant protein models



SUL为氟啶虫胺腈分子;绿色虚线表示 $\beta$ 1亚基第81和62位氨基酸(等同第67和48位氨基酸)到氟啶虫胺腈的距离。SUL is the sulfoxaflor; the distance between the amino acids at positions 81 and 62 (equivalent to the amino acids at positions 67 and 48) of  $\beta$ 1 subunit and sulfoxaflor is labeled with green dash line.

图5 氟啶虫胺腈与棉蚜nAChR敏感型(A)和R81T(B)、

V62I(C)及R81T-V62I(D)突变型蛋白模型的对接构象

Fig. 5 The docking conformations of *Aphis gossypii* nAChR sensitive model (A) and R81T (B), V62I (C) and R81T-V62I (D) mutant protein models with sulfoxaflor

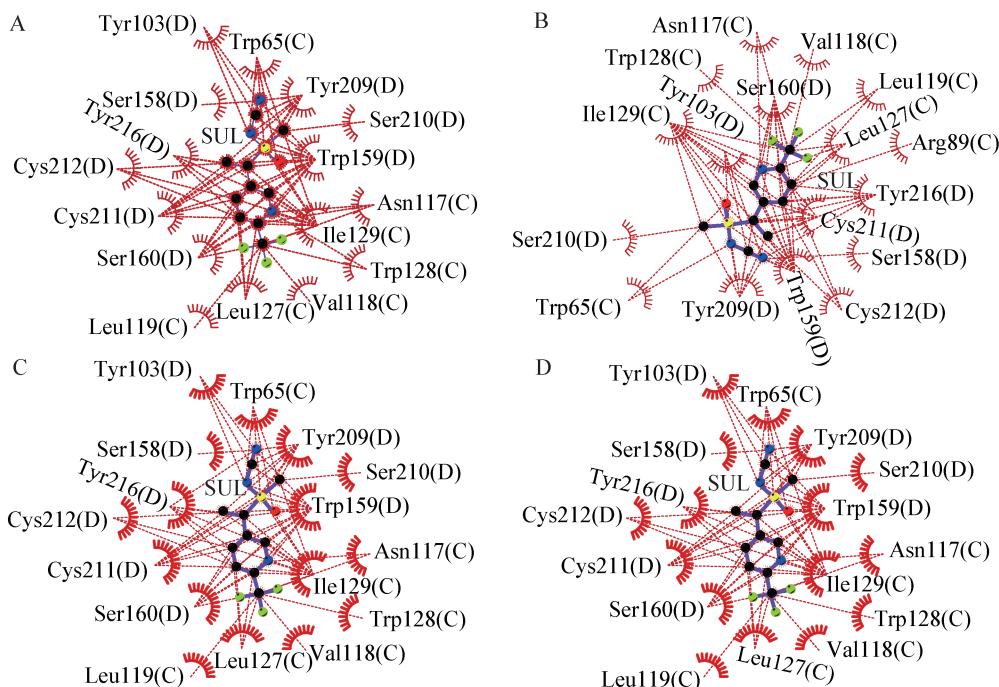
靶标抗性是产生抗性的主要机制之一。nAChR  $\beta$ 1亚基的R81T突变导致棉蚜对吡虫啉产生抗性的结论已被证实(Hirata et al., 2017),但是在黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 中该突变对氟啶虫胺腈的抗性无明显影响(Homem et al., 2020),且在桃蚜中不能产生对氟啶虫胺腈的靶标抗性(Mezei et al., 2020)。本研究通过分子对接试验进一步证实R81T突变降低了吡虫啉与棉蚜nAChR间的亲和力,但对氟啶虫胺腈与棉蚜nAChR的结合并无明显影响,这与Wang et al.(2016)在桃蚜中的研究结果类似。

除了R81T突变外,棉蚜nAChR的 $\beta$ 1亚基还存在V62I突变(Chen et al., 2017)。本研究通过分子对接试验证实了V62I单突变和R81T-V62I共同突变不仅明显改变了吡虫啉与棉蚜nAChR的结合构象,还改变了吡虫啉与棉蚜nAChR间的结合能、静电能和抑制常数,导致吡虫啉与棉蚜nAChR的亲和力降低。这说明V62I单突变和R81T-V62I共同突变会导致棉蚜对吡虫啉产生靶标抗性。虽然V62I单突变和R81T-V62I共同突变对吡虫啉与棉蚜nAChR结合构象的影响明显大于R81T单突变,但是V62I单突变和R81T-V62I共同突变对结合能和

抑制常数的改变要弱于R81T单突变。由于目前缺乏对V62I单突变和R81T-V62I共同突变的研究,因此不能确定哪一种突变对吡虫啉与棉蚜nAChR的结合影响更大。R81T、V62I单突变和R81T-V62I共同突变对氟啶虫胺腈与棉蚜nAChR的结合能力无明显影响。这可能是因为氟啶虫胺腈的作用模式不同于吡虫啉。一方面,乙酰胆碱结合位点不是氟啶虫胺腈的最适结合位点。如Watson et al.(2011)研究证实氟啶虫胺腈以弱亲合力取代<sup>[3]H</sup>-吡虫啉,氟啶虫胺腈的抑制常数为265.0 nmol/L,显著高于吡虫啉的抑制常数5.1 nmol/L。另一方面,氟啶虫胺腈与吡虫啉可能作用于不同的烟碱型乙酰胆碱受体亚型。如Perry et al.(2021)研究发现,当黑腹果蝇的nAChR的 $\alpha_1$ 、 $\alpha_2$ 、 $\beta_1$ 和 $\beta_2$ 亚基被敲除后对吡虫啉产

生了8.9~23.8倍的抗性,而只有 $\beta_1$ 亚基被敲除后才导致黑腹果蝇对氟啶虫胺腈产生抗性。

综上所述,棉蚜烟碱型AChR的V62I单突变和R81T-V62I共同突变会导致其对吡虫啉产生靶标抗性,而R81T、V62I单突变和R81T-V62I共同突变对氟啶虫胺腈的抗性无明显影响,说明棉蚜的V62I单突变和R81T-V62I共同突变不会导致其对吡虫啉与氟啶虫胺腈产生交互抗性。但是,我国棉蚜对新烟碱类杀虫剂的抗性机制除了靶标突变以外,还发现细胞色素P450的过表达也是棉蚜对新烟碱类杀虫剂产生抗性的重要机制之一,因此,对新烟碱类杀虫剂具有高抗性的棉蚜田间种群也会因为P450过表达而对氟啶虫胺腈产生一定水平的交互抗性,但仍需进行进一步的研究验证。



SUL为氟啶虫胺腈分子;红色部分表示氨基酸残基与氟啶虫胺腈间的疏水作用。(C)和(D)分别为位于 $\beta_1$ 亚基和 $\alpha_2$ 亚基上的氨基酸残基。SUL is the sulfoxaflor. The red section represents the hydrophobic interaction between amino acid residues and sulfoxaflor. (C) and (D) are the amino acid residues that located in  $\beta_1$  and  $\alpha_2$  subunits respectively.

图6 氟啶虫胺腈与棉蚜nAChR敏感型(A)和R81T(B)、V62I(C)及R81T-V62I(D)突变型蛋白模型间的疏水作用

Fig. 6 The hydrophobic interaction between sulfoxaflor and *Aphis gossypii* nAChR sensitive model (A) and R81T (B), V62I (C) and R81T-V62I (D) mutant protein models

## 参考文献 (References)

- An JJ, Dang ZH, Gao ZL, Lü HY, Peng JH, Pan WL, Li YF. 2018. Sensitivity baseline and resistance of Hebei *Aphis gossypii* Glover population to neonicotinoid insecticides. Journal of Hebei Agricultural University, 41(4): 112–116 (in Chinese) [安静杰, 党志红, 高占林, 岳海英, 彭建红, 潘文亮, 李耀发. 2018. 河北省棉蚜对新烟碱类杀虫剂敏感基线及抗药性水平. 河北农业大学学报, 41(4): 112–116]
- An JJ, Gao ZL, Dang ZH, Yan X, Pan WL, Li YF. 2020. Development

and risk assessment of resistance to sulfoxaflor in cotton aphid (*Aphis gossypii*). Journal of Hebei Agricultural University, 43 (1): 76–81 (in Chinese) [安静杰, 高占林, 党志红, 闫秀, 潘文亮, 李耀发. 2020. 棉蚜对氟啶虫胺腈抗性发展动态及田间种群抗性风险评估. 河北农业大学学报, 43(1): 76–81]

Chen XW, Li F, Chen AQ, Ma KS, Liang PZ, Liu Y, Song DL, Gao XW. 2017. Both point mutations and low expression levels of the nicotinic acetylcholine receptor  $\beta_1$  subunit are associated with imidacloprid resistance in an *Aphis gossypii* (Glover) popu-

- lation from a Bt cotton field in China. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 141: 1–8.
- Chen XW, Tang CY, Ma KS, Xia J, Song DL, Gao XW. 2020. Overexpression of UDP-glycosyltransferase potentially involved in insecticide resistance in *Aphis gossypii* Glover collected from Bt cotton fields in China. *Pest Management Science*, 76(4): 1371–1377.
- Chen XW, Xia J, Shang QL, Song DL, Gao XW. 2019. UDP-glucosyltransferases potentially contribute to imidacloprid resistance in *Aphis gossypii* Glover based on transcriptomic and proteomic analyses. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 159: 98–106.
- Cui L, Zhang J, Qi HL, Wang QQ, Lu YH, Rui CH. 2016. Monitoring and mechanisms of imidacloprid resistance in *Aphis gossypii* (Hemiptera: Aphidiidae) in the main cotton production areas of China. *Acta Entomologica Sinica*, 59(11): 1246–1253 (in Chinese) [崔丽, 张靖, 齐浩亮, 王芹芹, 陆宴辉, 芮昌辉. 2016. 我国棉花主产区棉蚜对吡虫啉的抗性监测及抗性机理. 昆虫学报, 59(11): 1246–1253].
- Ebert TA, Cartwright BO. 1997. Biology and ecology of *Aphis gossypii* Glover (Homoptera: Aphididae). *Southwestern Entomologist*, 22(1): 116–153.
- Gao ZL, Li YF, Dang ZH, Pan WL. 2008. A study on the development of *Aphis gossypii* resistance to imidacloprid etc. in the different areas of Hebei Province. *Journal of Agricultural University of Hebei*, 31(3): 81–84 (in Chinese) [高占林, 李耀发, 党志红, 潘文亮. 2008. 河北省不同地区棉蚜对吡虫啉等杀虫剂抗药性发展动态研究. 河北农业大学学报, 31(3): 81–84].
- Guo TF, Ma YP, Ding RR, Du J, Zhou J, Li GP, Cai XL, Wang GP, Zhao FQ, Li JS, et al. 2012. Resistance of the *Aphis gossypii* populations from main cotton area in Xinjiang to imidacloprid and acetamiprid. *China Cotton*, 39(12): 4–5, 10 (in Chinese) [郭天凤, 马野萍, 丁荣荣, 杜晶, 周晶, 李国萍, 蔡晓丽, 王国平, 赵富强, 李家胜, 等. 2012. 新疆主要植棉区棉蚜对吡虫啉和啶虫脒的抗性评价. 中国棉花, 39(12): 4–5, 10].
- Hirata K, Jouraku A, Kuwazaki S, Kanazawa J, Iwasa T. 2017. The R81T mutation in the nicotinic acetylcholine receptor of *Aphis gossypii* is associated with neonicotinoid insecticide resistance with differential effects for cyano- and nitro-substituted neonicotinoids. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 143: 57–65.
- Homem RA, Butterly B, Richardson E, Tan Y, Field LM, Williamson MS, Emry Davies TG. 2020. Evolutionary trade-offs of insecticide resistance: the fitness costs associated with target-site mutations in the nAChR of *Drosophila melanogaster*. *Molecular Ecology*, 29(14): 2661–2675.
- Kim J, Cha DJ, Kwon M, Kim GH, Lee SH. 2017. Mutation and down-regulation of nAChR beta1 subunit is associated with imidacloprid resistance in the *Aphis gossypii*. *Mysore Journal of Agricultural Sciences*, 51(S): 108–113.
- Liang Y, Zhang S, Shao ZR, Gao XW. 2013. Insecticide resistance in and chemical control of the cotton aphid, *Aphis gossypii* (Glover). *Plant Protection*, 39(5): 70–80 (in Chinese) [梁彦, 张帅, 邵振润, 高希武. 2013. 棉蚜抗药性及其化学防治. 植物保护, 39(5): 70–80].
- Ma KS, Tang QL, Liang PZ, Li JH, Gao XW. 2021. UDP-glycosyltransferases from the UGT344 family are involved in sulfoxaflor resistance in *Aphis gossypii* Glover. *Insects*, 12(4): 356.
- Ma KS, Tang QL, Zhang BZ, Liang P, Wang BM, Gao XW. 2019. Overexpression of multiple cytochrome P450 genes associated with sulfoxaflor resistance in *Aphis gossypii* Glover. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 157: 204–210.
- Mezei I, Bielza P, Siebert MW, Torne M, Gomez LE, Valverde-Garcia P, Belando A, Moreno I, Grávalos C, Cifuentes D, et al. 2020. Sulfoxaflor efficacy in the laboratory against imidacloprid-resistant and susceptible populations of the green peach aphid, *Myzus persicae*: impact of the R81T mutation in the nicotinic acetylcholine receptor. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 166: 104582.
- Patima W, Guo PP, Ma SJ, Gao XW, Zhang LJ, Zhang S, Ma DY. 2019. Resistance of different field populations of *Aphis gossypii* to ten insecticides in Xinjiang. *Plant Protection*, 45(6): 273–278 (in Chinese) [帕提玛·乌木尔汗, 郭佩佩, 马少军, 高希武, 张连俊, 张帅, 马德英. 2019. 新疆地区棉蚜田间种群对10种杀虫剂的抗性. 植物保护, 45(6): 273–278].
- Perry T, Chen W, Ghazali R, Yang YT, Christesen D, Martelli F, Lumb C, Bao Luong HN, Mitchell J, Holien JK, et al. 2021. Role of nicotinic acetylcholine receptor subunits in the mode of action of neonicotinoid, sulfoximine and spinosyn insecticides in *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 131: 103547.
- Wang KY, Guo QL, Xia XM, Wang HY, Liu TX. 2007. Resistance of *Aphis gossypii* (Homoptera: Aphididae) to selected insecticides on cotton from five cotton production regions in Shandong, China. *Journal of Pesticide Science*, 32(4): 372–378.
- Wang L, Zhu JS, Cui L, Wang QQ, Huang WL, Ji XJ, Yang QJ, Rui CH. 2021. Overexpression of ATP-binding cassette transporters associated with sulfoxaflor resistance in *Aphis gossypii* Glover. *Pest Management Science*, 77(9): 4064–4072.
- Wang NX, Watson GB, Loso MR, Sparks TC. 2016. Molecular modeling of sulfoxaflor and neonicotinoid binding in insect nicotinic acetylcholine receptors: impact of the *Myzus β1* R81T mutation. *Pest Management Science*, 72(8): 1467–1474.
- Watson GB, Loso MR, Babcock JM, Hasler JM, Letherer TJ, Young CD, Zhu YM, Casida JE, Sparks TC. 2011. Novel nicotinic action of the sulfoximine insecticide sulfoxaflor. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 41(7): 432–439.
- Xia J. 2019. Resistance monitoring of cotton aphid and the regulation mechanism of miRNA on UGTs. Master thesis. Beijing: China Agricultural University (in Chinese) [夏金. 2019. 棉蚜抗药性监测及miRNA对UGTs的调控机制. 硕士学位论文. 北京: 中国农业大学].
- Xu XY, Yang ZK, Zhu K, Li HL, Qin ZH, Duan HX. 2020. Computational insight on the binding and selectivity of target-subunit-dependent for neonicotinoid insecticides. *Journal of Molecular Graphics & Modelling*, 98: 107586.
- Zhu YM, Loso MR, Watson GB, Sparks TC, Rogers RB, Huang JX, Gerwick BC, Babcock JM, Kelley D, Hegde VB, et al. 2011. Discovery and characterization of sulfoxaflor, a novel insecticide targeting sap-feeding pests. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(7): 2950–2957.

(责任编辑:李美娟)